

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10701

研究課題名(和文)膵癌腹膜播種形成を導く細胞クリアランスと腹膜中皮の新たな役割—防御から促進へ—

研究課題名(英文)Cellular clearance leading to peritoneal dissemination of pancreatic cancer and a new role of peritoneal mesothelium -From defense to promotion-

研究代表者

井上 重隆 (INOUE, Shigetaka)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00529802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓は脂肪織に囲まれた後腹膜臓器であり、膵外への浸潤・播種に関わる点で重要と考えられる脂肪細胞関連の癌間質相互作用について検討した。脂肪組織由来間質細胞は膵癌に浸潤し活性化するとCAFとして作用し、サイトカインを分泌し、高密度のコラーゲンマトリックスを生成することで腫瘍の進行、膵外浸潤を促進した。

また、leading cellの解明のため、KPCマウスを用いた実験で、acinar-to-ductal metaplasia(ADM)が腫瘍浸潤部と関連して存在していること、さらにヒト腫瘍のADM領域の遺伝子発現解析により、癌関連のADMと腺房の萎縮が局所の腫瘍細胞浸潤に寄与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は豊富な細胞外基質を伴うdesmoplasiaを病理学的特徴とし、以前より癌細胞と間質細胞が相互に作用しその悪性度を増す癌間質相互作用の重要性が示唆されており、微小環境における新たな癌間質相互作用のあり方に関する解析が進められている。しかし、膵癌腹膜播種に関しては、播種巣における微小環境まで含めて検討した解析はない。

本研究においては脂肪細胞や膵星細胞の癌間質相互作用、特に膵癌浸潤促進因子についての新たな知見を示すことができた。今後、PMCsを直接用いた実験を再検討することで、他の間質細胞で確認されたleadingなどを示すことができれば、腹膜播種形成機序の解明に近づくと考えている。

研究成果の概要(英文)：First, we focused on adipocytes, because of the pancreas is a retroperitoneal organ surrounded by adipose tissue, and adipocytes are considered to have a significant relationship with infiltration and dissemination outside the pancreas.

Adipose tissue-derived stromal cells infiltrated pancreatic cancer and, when activated, acted as fibroblasts and secreted cytokines. Furthermore, by producing a high-density collagen matrix, it promoted extra-pancreatic invasion.

We also conducted experiments using KPC mice for the purpose of clarifying the leading cells. We have shown that acinar-to-ductal metaplasia (ADM) exists in association with tumor infiltrate.

Moreover, gene expression analysis of ADM region of human tumors showed that cancer-related ADM and acinar atrophy contributed to local tumor cell invasion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 播種 腹膜中皮細胞 leading cell spheroid CAF 脂肪由来間質細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は豊富な細胞外基質を伴う desmoplasia を病理学的特徴としており、以前より癌細胞と間質細胞が相互に作用しその悪性度を増す癌間質相互作用の重要性が認識されていた (Bhowmick, Nature, 2004)。現在も微小環境における新たな癌間質相互作用のあり方に関する解析が世界的に進められている。

腹膜播種形成に関して、腹膜の表層に存在する腹膜中皮細胞(peritoneal mesothelial cells; PMCs)は、本来防御的な役割を持つとされる(Mutsaers, Int J Biochem Cell Biol, 2004)が、癌関連線維芽細胞が PMCs の中皮間葉移行に由来するとの報告 (Sandoval, J pathol, 2013) もある。また、spheroid 形成した卵巣癌細胞が PMCs を clearance する (mesothelial clearance) こと (Iwanicki, Cancer Discov, 2011) が報告され、PMCs と腹膜播種形成との関連が目まぐるしく注目されている。また、本研究者らも膵癌の腹膜播種症例から樹立した間質細胞の特性を解析し、膵癌の腹膜播種形成を促進することを明らかにした (Int J oncol, 2014)。

しかし、これまでに膵癌の腹膜播種形成機序を間質細胞、特に PMCs の播種形成促進的な関与の観点から検討した報告はほとんどなく、PMC の形質転換やそれに基づく播種促進機序に関しては未知であった。

当研究室では、膵星細胞に機能的な heterogeneity が存在し、癌間質相互作用に深く関わる特定の PSC サブタイプが存在することを過去に報告しており、PMCs にも heterogeneity が存在し、播種形成を誘導する特定の細胞集団、特にクリアランス許容が高い集団や癌細胞の浸潤を先導するような細胞集団があるのではないかと仮説を構築した。以上より、腹膜播種巣における PMCs の heterogeneity とその播種形成を誘導する新たな役割を検討することで、膵癌腹膜播種形成機序の真の理解やこれまでにない切り口での治療法の開発につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

3D モデルや膵癌自然発生マウスモデルを用いて、膵癌細胞と腹膜中皮細胞との相互作用を含めた腹膜播種解析モデルにおける膵癌細胞の浸潤過程の検討を行い、播種を導く leading cell を同定し、その役割を検討する。また、膵癌細胞の Spheroid 形成依存性の mesothelial clearance に対する許容度を検討する。癌細胞以外の微小環境に存在する細胞に着目して浸潤・転移を検討していくことを目的とした。

3. 研究の方法

当初、以下の4つについて解明・確立することを計画した。

膵癌細胞によって誘導される PMCs の形質変化の解析と phenotyping
癌細胞と PMCs で 3D 共培養を行い、ECM リモデリングに関するそれぞれの遺伝子発現を網羅的に解析し、PMC の形質変化を誘導する責任遺伝子の同定を行う。

癌細胞浸潤を導く leading cell として機能する leading PMCs の同定とその leading 機序解明

膵癌細胞と PMCs の 3 次元共培養モデルや、KPC マウスに膵臓特異的 luciferase を導入したマウスを用いて腹膜播種微小転移モデルにおける細胞と基質の質的、量的に解析を行う。

mesothelial clearance の許容度が高い PMC 集団の同定とその機序の解明

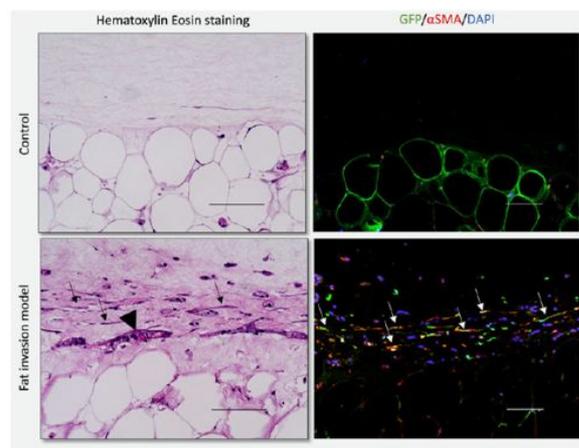
膵癌組織から樹立した、生体組織を疑似した立体的組織構造体であるオルガノイドや、より生体に近い Ex vivo 腹膜播種モデルを用いて、PMCs との相互作用を検討する。

特定の PMCs を標的とした播種形成制御法の確立

4. 研究成果

膵臓は脂肪組織に囲まれた後腹膜臓器であり、特に膵外浸潤に関わる点で、脂肪組織が主要な間質成分となっている可能性を考え、脂肪細胞に関わる癌間質相互作用について検討した。

脂肪組織由来間質細胞 (ASC) に着目し、C57BL / 6-Tg (CAG-EGFP) マウスの内臓脂肪を用いた in vitro および in vivo 実験により、ASC が腫瘍微小環境内に誘導され、CAF の特徴の一つである SMA を発現していることを確認した。次にヒト ASC の機能を評価するため、ヒト膵癌患者の切除標本から樹立した ASC を用いてコラーゲンマトリックスの構造変化について評価したところ、ASC によって産生されたコラーゲンマトリックスは、癌細胞馴化培地との共培養においてより緻密な構造に変化し、膵癌細胞の



Fat invasion modelにおいてαSMA・GFP陽性のASCが誘導された。
論文より引用(自験例)

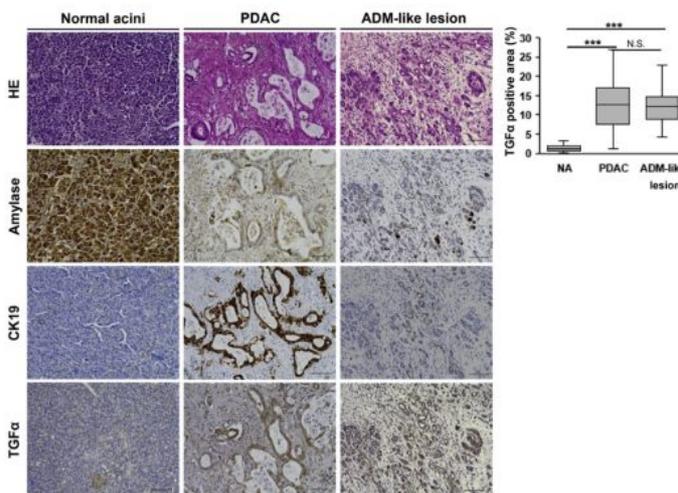
遊走能を促進することがわかった。また、in vivoの実験において、GFPを発現したマウスの内臓脂肪を皮下移植し、定着した脂肪内への腫瘍細胞を移植すると、通常の皮下移植モデル、同所移植モデルに比べて腫瘍の進行が促進し、病理学的観察においても SMA 陽性細胞と間質の増加が観察された。これらのことから、ASCは膵癌に浸潤し活性化するとCAFとして作用し、サイトカインを分泌するだけでなく、高密度のコラーゲンマトリックスを生成することによっても、腫瘍の進行、膵外浸潤を促進することを報告した。



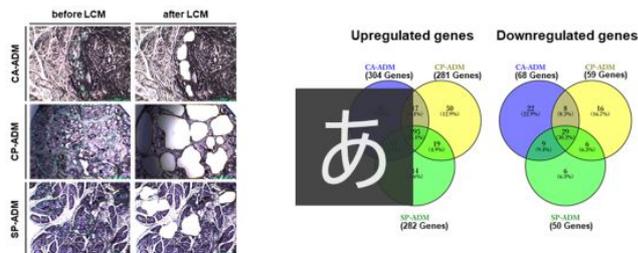
ASCのみ・皮下移植・ASC内移植・同所移植における腫瘍形成能の評価
論文より引用(自験例)

また、ヒト膵癌オルガノイドを用いて、間質細胞(膵星細胞)との共培養実験を行ったところ、オルガノイドの形態変化、浸潤能の上昇をもたらし、膵星細胞による接触が膵癌の間質浸潤を誘導することを論文報告した。さらに同様のモデルでの共培養を行い、間質細胞の有無で発現を比較し、浸潤を誘導する因子となり得る候補を検索し、検討しているが、未だ有意な結果には至っていない。

leading 機序の解明という面でのアプローチとして、局所的な膵実質への広範な癌細胞の浸潤を示す KPC マウスを用いた実験を行い、acinar-to-ductal metaplasia (ADM)が腫瘍浸潤部と関連して存在していること、また、ヒト腫瘍の分析により、癌関連 ADM の領域において TGF α が陽性となっており、この TGF α 発現が原発腫瘍のサイズと生存期間の短縮に関連していることが明らかとなった。Laser-capture microdissectionを用いたADM領域の遺伝子発現解析により、癌関連 ADM、散発性 ADM、慢性膵炎 ADM の異なる表現型プロファイルを特定した。ADM を駆動するメカニズムが特定の組織の微小環境によって異なり、癌関連の ADM と腺房の萎縮が、局所の腫瘍細胞浸潤に寄与していることが示唆された。

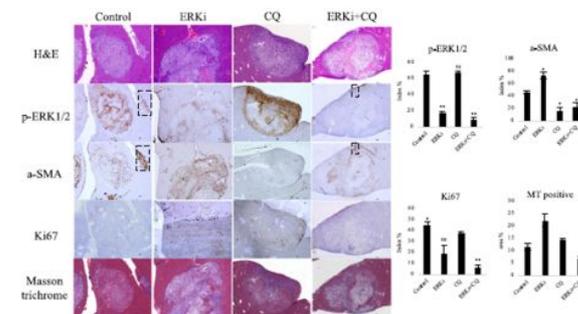


腫瘍浸潤部におけるADM領域と、TGF α 発現の関係
論文より引用(自験例)



LCMIによるADM領域の遺伝子発現解析
論文より引用(自験例)

さらに、トランスジェニックマウスに膵癌細胞を移植し、免疫組織化学的染色を行ったところ、癌細胞と間質細胞の両方で p-ERK1 / 2 の発現を認め、特に癌関連の膵星細胞で強く発現していた。特に、癌関連膵星細胞は ERK1 / 2 阻害剤治療に対し有意に反応し、ERK1 / 2 の抑制は、膵癌細胞の EMT 移行を抑制し、細胞老化マーカーを上方制御し、癌関連膵星細胞のオートファジーを活性化することで、癌間質相互作用および転移を抑制していることを報告した。



ERK1/2阻害剤の有無におけるリン酸化ERK等の免疫染色
論文より引用(自験例)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yan Z, Ohuchida K, Fei S, Zheng B, Guan W, Feng H, Kibe S, Ando Y, Koikawa K, Abe T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M	4. 巻 38
2. 論文標題 Inhibition of ERK1/2 in cancer-associated pancreatic stellate cells suppresses cancer-stromal interaction and metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-019-1226-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kibe S, Ohuchida K, Ando Y, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Endo S, Koikawa K, Okumura T, Iwamoto C, Shindo K, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M.	4. 巻 444
2. 論文標題 Cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia within the invasive front of pancreatic cancer contributes to local invasion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 70-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koikawa K, Ohuchida K, Takesue S, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Endo S, Abe T, Okumura T, Horioka K, Sada M, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Ohuchida R, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Hashizume M, Nakamura M.	4. 巻 412
2. 論文標題 Pancreatic stellate cells reorganize matrix components and lead pancreatic cancer invasion via the function of Endo180	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 143 ~ 154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2017.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新川智彦、飯子龍、大内田研宙、大坪慶志輝、松本奏吉、米永晃子、相良亜希子、関維雨、馮海旻、安藤陽平、岐部晋、武居晋、中山宏道、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、永井俊太郎、大塚隆生、中村雅史
2. 発表標題 膵癌におけるERK1/2阻害剤による癌間質相互作用の抑制効果の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 肥川和寛、大内田研宙、森山大樹、仲田興平、宮坂義浩、真鍋達也、大塚隆生、永井英司、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 膵星細胞が誘導する新たな膵癌局所微小浸潤機序の解明
3. 学会等名 第25回日本消化器関連学会週間 第15回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K Koikawa, K Ohuchida, Y Ando, S Kibe, H Nakayama, S Takesue, Z Yan, T Abe, T Okumura, C Iwamoto, T Moriyama, K Nakata, Y Miyasaka, Y Okabe, T Ohtuka, K Mizumoto, M Nakamura
2. 発表標題 Pancreatic organoids elucidate the new mechanisms of pancreatic cancer local invasion
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	進藤 幸治 (SHINDO Koji) (00788432)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐田 政史 (SADA Masafumi) (10783508)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	宮坂 義浩 (MIYASAKA Yoshihiro) (40507795)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	三好 圭 (MIYOSHI Kei) (70755272)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	大内田 研宙 (OHUCHIDA Kenoki) (20452708)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	